

22. 7. 2004

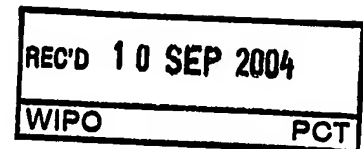
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 2 2 4 9 6
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 4 2 2 4 9 6]



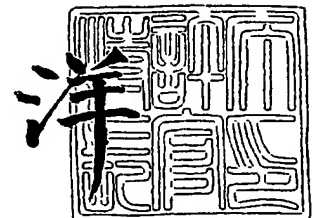
出 願 人 旭化成ファーマ株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 8 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 X1031512
【提出日】 平成15年12月19日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 B01J 13/00
【発明者】
 【住所又は居所】 宮崎県延岡市旭町2丁目1番3号 旭化成ファーマ株式会社内
 【氏名】 本郷 智子
【発明者】
 【住所又は居所】 宮崎県延岡市旭町2丁目1番3号 旭化成ファーマ株式会社内
 【氏名】 浜崎 直子
【発明者】
 【住所又は居所】 宮崎県延岡市旭町2丁目1番3号 旭化成ファーマ株式会社内
 【氏名】 井出 正一
【特許出願人】
 【識別番号】 303046299
 【住所又は居所】 東京都千代田区神田美土代町9番地1
 【氏名又は名称】 旭化成ファーマ株式会社
 【代表者】 中岡 靖晶
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 228073
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

少なくとも pH 4～11 の範囲で安定であることを特徴とする平均粒子径 1～100 nm の金属コロイド粒子を含有する金属コロイド溶液。

【請求項 2】

50℃1年間の保存で安定であることを特徴とする平均粒子径 1～100 nm の金属コロイド粒子を含有する金属コロイド溶液。

【請求項 3】

平均粒子径が 15～25 nm である請求項 1 あるいは 2 に記載の金属コロイド溶液。

【請求項 4】

水溶性高分子量分散剤を含む請求項 1～3 に記載の金属コロイド溶液

【請求項 5】

(a)～(c) を含むことを特徴とする請求項 3 に記載の金属コロイド溶液。

(a) 平均粒子径 15～25 nm の金属コロイド粒子

(b) N 基を含有する水溶性高分子量分散剤

(c) 水または／および水溶性有機溶剤

【請求項 6】

金属コロイド粒子が金、銀、白金、ロジウム、パラジウム、ルテニウム、イリジウム、オスmium、鉄、銅のうち少なくとも一種からなる請求項 1～5 記載の金属コロイド溶液。

【請求項 7】

水溶性高分子量分散剤の分子量が、1000～200万の範囲である請求項 4 あるいは 5 記載の金属コロイド溶液。

【請求項 8】

界面活性剤を含有する請求項 1～7 記載の金属コロイド溶液。

【請求項 9】

請求項 1～8 記載の金属コロイド溶液を用いて、ウイルス除去膜のインテグリティ試験を行なう方法。

【請求項 10】

請求項 3 あるいは 5 記載の金属コロイド溶液を用いて、小ウイルスをターゲットとしたウイルス除去膜のインテグリティ試験を行なう方法。

【書類名】明細書**【発明の名称】金属コロイド溶液とそれを用いた膜のインテグリティ試験方法****【技術分野】****【0001】**

本発明は、保存安定性、温度安定性、pH安定性を示す、ウイルス除去膜のインテグリティ試験時のウイルス代替粒子として有用な金属コロイド溶液に関する。

【背景技術】**【0002】**

これまで、平均粒子径が1～100nmの金属コロイド粒子は粒径の小ささ、表面積の大きさから多くの機能材料に応用されているが、このような粒子は粒子間力が非常に強いため、水溶液に加えても凝集を起こしやすく、全く均一に分散させることは困難であった。さらに金属コロイド粒子を安定に分散させるためには溶液のpHを特定の範囲に制御する必要がある、使用できるpH領域が著しく制限される問題があった。(特許文献1)

【0003】

また、ウイルス除去膜において既に代替粒子を用いた膜のインテグリティ試験方法が開示されている。代替粒子として用いた金属コロイドの濾過による除去性と膜のウイルス除去性との間には非常によい相関関係が見られる。インテグリティ試験に際しては、ウイルス除去膜としての使用後に、洗浄処理を行い、膜の残存物を可能な限り少なくする工程が必要である。しかし、洗浄剤にはアルカリ等の溶液を使用するケースがあり、従来の金属コロイド溶液では限られたpHのみでしか使用できなかったため、洗浄剤で洗浄後、膜中のpHを厳密に制御する洗浄処理が必要となり操作が非常に煩雑であった。(特許文献2、非特許文献1)

【0004】

さらにパルボウイルスのような径が20～25nmの小ウイルスをターゲットとしたウイルス除去膜のインテグリティ試験においては、これまで、ウイルス除去性と相関性のあるウイルス粒子の代替粒子すらなかった。高い小ウイルス除去性の持続性と高いタンパク透過性を兼ね備えた特性を発現するためには、特殊な膜構造を有することが必要(特許文献3)であり、そのような膜構造を持つウイルス除去膜用のインテグリティ試験においては、わずかな孔径差を検出できる金属コロイド溶液が要求される。しかし、そのような金属コロイド溶液は従来なかった。

【特許文献1】特開平8-141388号公報**【特許文献2】**特開平7-132215号公報**【特許文献3】**WO-2001-14047公報**【非特許文献1】**Hiroki Murakami (Etd.), Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Netherland, Kluwer Academic Publishers, Vol. 4, 1992, p.87-102**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明は、保存安定性、温度安定性、pH安定性を示す、ウイルス除去膜のインテグリティ試験に有用な、新規な金属コロイド溶液を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本発明は、

- (1) 少なくともpH4～11の範囲で安定であることを特徴とする平均粒子径1～100nmの金属コロイド粒子を含有する金属コロイド溶液、
- (2) 50℃1年間の保存で安定であることを特徴とする平均粒子径1～100nmの金属コロイド粒子を含有する金属コロイド溶液、
- (3) 平均粒子径が15～25nmである(1)あるいは(2)に記載の金属コロイド溶液、

- (4) 水溶性高分子量分散剤を含む (1) ~ (3) に記載の金属コロイド溶液、
- (5) (a) ~ (c) を含むことを特徴とする (3) に記載の金属コロイド溶液、
- (a) 平均粒子径 15 ~ 25 nm の金属コロイド粒子
- (b) N 基を含有する水溶性高分子量分散剤
- (c) 水または／および水溶性有機溶剤
- (6) 金属コロイド粒子が金、銀、白金、ロジウム、パラジウム、ルテニウム、イリジウム、オスmium、鉄、銅のうち少なくとも一種からなる (1) ~ (5) 記載の金属コロイド溶液、
- (7) 水溶性高分子量分散剤の分子量が、1000 ~ 200 万の範囲である (4) あるいは (5) 記載の金属コロイド溶液、
- (8) 界面活性剤を含有する (1) ~ (7) 記載の金属コロイド溶液、
- (9) (1) ~ (8) 記載の金属コロイド溶液を用いて、ウイルス除去膜のインテグリティ試験を行なう方法、
- (10) (3) あるいは (5) 記載の金属コロイド溶液を用いて、小ウイルスをターゲットとしたウイルス除去膜のインテグリティ試験を行なう方法、に関する。

【発明の効果】

【0007】

本発明の金属コロイド溶液は、保存安定性、温度安定性、pH 安定性がある。さらに、本発明の金属コロイド溶液をウイルス除去膜で濾過した際の除去性はウイルス除去性との相関性を持っており、ウイルス除去膜のインテグリティ試験においてこれまでできなかった試験時の液 pH 範囲の拡大、試験時間（洗浄時間）の短縮、操作の簡略化、ウイルス除去膜のわずかな孔径差による検出（検出力が高い）が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下、本発明について具体的に説明する。

【0009】

本発明の金属コロイド粒子をなす金属とは、例えば、金、銀、白金、ロジウム、パラジウム、ルテニウム、イリジウム、オスmium、鉄、銅のうち少なくとも一種からなる金属が挙げられる。好ましくは金である。

【0010】

本発明の金属コロイド溶液としては、金属コロイド粒子、水溶性高分子量分散剤、水または／および水溶性有機溶剤を含む金属コロイド溶液が例示される。

本発明の金属コロイド溶液中に含まれる金属コロイド粒子の平均粒子径は、分散状態を安定に維持するためには 1 ~ 100 nm の範囲が好ましく、更に好ましくは、1 ~ 50 nm の範囲である。1 nm 以上であることがウイルス除去膜のインテグリティ試験用として現実的であり、100 nm 以下であることが分散状態の安定化の観点から好ましい。

【0011】

また、パルボウイルスのような径が 20 ~ 25 nm の小ウイルスをターゲットとしたウイルス除去膜のインテグリティ試験においては、平均粒子径が 15 ~ 25 nm の範囲が好ましく、更に好ましくは 15 ~ 22 nm の範囲である。平均粒子径が 15 nm ~ 25 nm の金属コロイド溶液を、小ウイルスをターゲットとしたウイルス除去膜で濾過した際の除去性はパルボウイルスのような小ウイルスの膜による除去性との相関性が高い。

【0012】

本発明の金属コロイドの含有量としては 1 ~ 1000 ppm の範囲が好ましい。分散安定性の観点から 1000 ppm 以下が好ましく、インテグリティ試験用としての使用しやすさから 1 ppm 以上が好ましい。より好ましくは 10 ~ 800 ppm の範囲であり、さらに好ましくは 20 ~ 700 ppm の範囲である。

【0013】

本発明の水溶性高分子量分散剤は、金属コロイド粒子に対して親和性及び溶媒に対して親和性（溶媒和）を有する高分子である。なかでも N 基を含有する高分子であることが好

ましい。N基は好ましくはピロリドン基を有するものであり、ポリビニルピロリドン、N-ビニルピロリドン/スチレン共重合ポリマー、N-ビニルピロリドン/酢酸ビニル共重合ポリマー、等の中から選ばれた少なくとも1つ以上のポリマーである。水溶性高分子量分散剤は、金属コロイドに対して直接的に保護コロイド的に作用し、コロイド同士の凝集を防いだり、表面の状態（電位）を一定に保つ作用、他の素材に対する吸着を抑制する作用がある。また、溶液の環境変化（温度、pH）に対しても安定である。

【0014】

本発明で用いる水溶性高分子量分散剤の分子量は、1000～200万の範囲が好ましい。より好ましくは1000～10万の範囲であり、さらに好ましくは1000～5万の範囲である。分子量が1000以上であることが、金属コロイドの分散の安定化の観点から好ましく、分子量が200万以下であることが溶媒への溶解性、取り扱いやすさ、金属コロイドの粒子サイズへの影響の与えにくさ、分散の安定性といった観点から好ましい。

【0015】

本発明で用いる水溶性高分子量分散剤の添加量は、0.001～10重量%の範囲である。好ましくは0.01～5重量%の範囲であり、さらに好ましくは0.1～5重量%の範囲である。0.001重量%以上であることが、分散安定化効果の観点から好ましい。

また10重量%以下であることが、溶媒に対する溶解性がよくなり、取り扱いやすくなるといった観点から好ましい。

【0016】

本発明の金属コロイド溶液にはさらに一種以上の界面活性剤を含むことができる。界面活性剤を添加させることによって、例えばより分散安定性を向上させたり、膜素材への吸着を抑制させる効果が付与される。界面活性剤としては、陰イオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤を用いることができる。陰イオン界面活性剤としてはSDS、非イオン性界面活性剤としてはTriton X-100、Tween 20、Tween 80等を用いることができる。その含有量は0.001～5.0重量%の範囲である。好ましくは0.01～3重量%、さらに好ましくは0.05～2.0重量%の範囲である。

【0017】

本発明の金属コロイド溶液には必要に応じてキレート剤、有機酸およびその塩類をさらに含有していてもよい。キレート剤を含有することによって、例えば分散安定性を向上させたり、膜素材への吸着を抑制させる効果が付与される。キレート剤としてはEDTA等を用いることができる。有機酸およびその塩類としては、クエン酸、クエン酸ナトリウム等を用いることができる。

【0018】

本発明で用いる金属コロイド溶液は、原料金属化合物を、溶媒に溶解し、金属に還元することにより得られる。原料金属化合物としては、塩化金酸、硝酸銀、塩化白金酸、塩化ロジウム（III）、塩化パラジウム（II）、塩化ルテニウム（III）、塩化イリジウム酸塩、酸化オスミウム（VII）などを用いることができる。還元剤としては、クエン酸、クエン酸ナトリウム、タンニン酸、ヒドラジン、水素化ほう素ナトリウムなどがあげられる。反応温度は室温から溶媒の沸点までの温度である。好ましくは25～100℃、さらに好ましくは40～100℃である。また、反応時間は数分から数日である。さらに還元反応後に、水溶性高分子量分散剤を所定量加えることにより金属コロイド溶液を得ることができる。その後、さらに必要に応じて界面活性剤やキレート剤、有機酸およびその塩類を所定量加えることもできる。

【0019】

本発明の原料金属化合物の溶媒および金属コロイド溶液の分散溶媒としては、一般に水、水溶性有機溶剤、またはこれらの混合物である。水溶性有機溶剤としては、エタノール、メタノール、エチレングリコール等を挙げることができる。好ましくは水、エタノール及びメタノール及びこれらの混合物である。さらに好ましくは水である。

本発明で金属コロイド溶液の安定性は、保存安定性、温度安定性、pH安定性であれば、

光学特性を測定すること、または肉眼での凝集物生成、沈殿物形成等により測定することができ、塩に対する安定性であれば塩析等によって確認可能である。

【0020】

光学特性の測定とは分光光度計を用いる金属コロイド溶液のスペクトル測定による極大吸収波長測定である。分光光度計としては、可視および紫外波長領域まで測定可能な性能を有する装置、例えば島津製作所製の紫外可視分光光度計 UV-160Aなどを用いることができる。極大吸収波長は金属コロイド粒子の平均粒子径を代表する。本発明において、50℃1年間の保存で安定である金属コロイド溶液とは、例えば50℃で1年間放置した場合の経時的な極大吸収波長の変化において、0日目の極大吸収波長との差が-1.5~+1.5nmの範囲であることをいう。好ましくは-1~+1nmの範囲である。また、肉眼的には凝集物の生成や沈殿物の形成の有無でも安定性を確認することができる。

【0021】

また、本発明において、少なくともpH4~11の範囲で安定であるとは、所定のpHで、180日間室温で保存した後の、極大吸収波長の変化において、0日目の極大吸収波長との差が-1.5~+1.5nmの範囲であることをいう。好ましくは-1~+1nmの範囲である。

【0022】

また、本発明の金属コロイド溶液の安定性は、塩析可能な塩濃度でも表すことができる。ここでいう塩析とは、金属コロイド溶液に塩を加えた後に、一晚放置後、金属コロイド溶液が金属コロイド粒子の沈殿物として沈降し、完全に固/液分離する状態になることを言う。塩析する添加時の塩濃度が高い程、塩に対して安定である。本発明において、塩析による確認における塩に対する安定な金属コロイド溶液とは、CaCl₂を最低0.2M加えた後、一晚放置しても沈殿しないことをいう。

【0023】

本発明のインテグリティ試験とは、タンパクや生理活性物質等を含む溶液の中からウイルスを除去する目的で使用されるウイルス除去膜の使用後の性能確認のために行われる試験のことである。インテグリティ試験として、1)バブルポイント法、2)膜が有する孔径分布の大きい孔の割合を測定する方法、3)代替粒子の濾過による方法がある。1)は除菌フィルターなどでも用いられている。測定原理は気体-液体の表面張力差を利用し、気体圧力をかけ最初に気泡が発生した圧力をバブルポイント値として定義している。

2)は例えば、液体-液体の低い界面張力を利用する方法である。なかでも3)のウイルス代替粒子の濾過方法は、その原理がウイルス除去と同じ、粒子のふり濾過であるために、同じメカニズム同士の特性値の相関関係を取ることができ信頼性が高いという特徴がある。さらに、金コロイドの濾過による方法は溶液の調整が容易であり、その濃度測定も簡単で精度がよいので好ましい。インテグリティ試験に際しては、ウイルス除去膜としての使用後に、洗浄処理を行い、膜の残存物(タンパク等)の測定に与える影響(残存物の詰まりなどによる膜の孔径分布変化)を可能なかぎり少なくする工程が必要である。本発明の金属コロイド溶液はpHに対する安定性が高いため、洗浄処理の簡素化が可能である。

【0024】

他にも本発明の金属コロイド溶液は、フォトクロミック材料、抗菌材料、防黴材料、防藻材料、磁性材料、非線形光学材料、顔料、触媒、導電性材料等に用いることができる。

【0025】

本発明の金属コロイド溶液を用いてインテグリティ試験を行なうには、常法を用いることができる。すなわち、濾過を行なった後のウイルス除去膜をアルカリ等を含んだタンパク除去剤等の洗浄液を使用し洗浄する。その後、膜中に残存するアルカリ溶液を酸で中和処理後、金属コロイド溶液を洗浄処理後のウイルス除去膜で濾過し、除去性を測定する。本発明の金属コロイド溶液は幅広いpH安定性を有するから、ウイルス除去膜のpH耐性等に応じて、適宜pHを選択できる利点がある。金属コロイド溶液の濃度測定は以下の方法で行う。金属コロイド溶液の吸収スペクトルを分光光度計などを用いて測定し、極大吸

収波長を特定する。極大吸収波長での金属コロイド溶液の吸光度を濾過前後で測定し、対数除去係数 (LRV) として表す。ここで、濾過前の吸光度を C_o 、濾過後の吸光度を C_f とすると対数除去係数は下記の式により求められる。

$$\text{対数除去係数 (LRV)} = \log_{10} (C_o / C_f)$$

【実施例】

【0026】

次に、実施例によって本発明を説明する。

【実施例1】

6. 0 mMの塩化金酸 (和光製、試薬特級) の水溶液 80 g を反応容器にとり、蒸留水を 320 g、4% クエン酸ナトリウム水溶液を 19.4 g 添加し、70℃ で 60 分反応を行った。この時の溶液中の金濃度は約 500 ppm であった。反応終了後、東京化成社製 PVP (K-15) (分子量 10000) 30% 水溶液を 39.8 g 添加した後、5% SDS 水溶液を 24.0 g 添加することによって濃厚で鮮やかな赤紫色の金コロイド溶液を得た。その後、本溶液を塩酸または水酸化ナトリウムを用いて pH = 4.7 ~ 5.3 に調整した。この金コロイド溶液をコロジオン膜張り付きメッシュ上で乾固し、透過型電子顕微鏡により観察した。金微粒子の分散状態は良好で、平均粒子径は約 18.5 nm であった。分光光度計により吸収スペクトルを測定したところ、金プラズモン吸収に由来する 520 ~ 530 nm に最大吸収が見られた。金プラズモン吸収に由来する吸収スペクトルは粒子径が数 nm ~ 数十 nm 程度の所謂ナノ粒子において見られるものである。また、極大吸収波長の値と平均粒子径の間には極めて高い相関関係があることが判っている。この金コロイド溶液の極大吸収波長の変化において、0 日目と各経過日数での極大吸収波長の差が -1.5 nm から +1.5 nm の範囲であり、50℃ の環境下で 1 年間安定であった。

【0027】

【実施例2】

WO-2001-14047 公報に記載の方法に従って、平均孔径 18.5 nm の銅アンモニア法再生セルロース多孔性中空糸膜からなる膜面積 0.01 m² のフィルターを製造した。実施例1の金コロイド溶液をさらに、pH = 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 の 0.27% SDS 水溶液で 10 倍に希釈し、さらに各 pH になるように微調整した希釈金コロイド溶液を用いて、定圧 Dead-end 法で、濾過圧力 26.7 kPa で濾過した。5 ~ 10 ml の濾液フラクションについて金コロイド濃度を吸光度測定より求め、LRV を算出した。結果を表1に示す。pH 4 から 11 の範囲でほぼ LRV = 2.3 の値を示し、この pH 範囲内では、インテグリティ試験において一定の LRV 値を示すことがわかった。

【0028】

【実施例3】

実施例1にて生成した金コロイド溶液を、塩酸または水酸化ナトリウムを用いて溶液の pH = 4.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 に変化させた。各 pH の金コロイド溶液に塩化カルシウムを添加し、十分攪拌混合した後、1 昼夜放置した。pH 4, 5, 7, 9, 11 の金コロイド溶液については塩化カルシウムを 0.2 M まで添加しても沈殿しなかった。

【0029】

【実施例4】

WO-2001-14047 公報に記載の方法に従って、平均孔径 18.0 nm から 21.0 nm の範囲の孔径が異なる銅アンモニア法再生セルロース多孔性中空糸膜を用いて、膜面積 0.01 m² のフィルターを製造した。実施例2の pH = 4 から 11 の希釈金コロイド溶液を上記の孔径違いのフィルターで濾過した。濾過方法は定圧 Dead-end 法で、濾過圧力は 26.7 kPa にて行った。5 ~ 10 ml の濾液フラクションについて金コロイド濃度を吸光度測定より求め、金コロイドの LRV を算出した。

また、指標ウイルスとしてブタパルボウイルス (PPV) を 5% 胎児牛血清を含んだ D-MEM 中に $10^{5.89}$ TCID₅₀ / ml になるように調製後、上記の孔径の異なる

中空糸膜からなる膜面積 0.001 m^2 のフィルターで濾過圧力 78.4 kPa にて濾過した。0～55 ml の濾液フラクションについてのウイルス濃度は ESK (ブタ腎) 細胞に対する 50% 細胞致死能から $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ として算出した。金コロイド除去性とウイルス除去性との相関関係を図 1 に示す。良好な相関関係を示し、この結果から本発明の金属コロイド溶液は小ウイルスをターゲットとしたウイルス除去膜のインテグリティ試験に使用可能である。

【0030】

【表 1】

実施例 2	
pH	LRV
2	1.40
3	1.86
4	2.25
5	2.34
7	2.36
9	2.36
11	2.38

【産業上の利用可能性】

【0031】

本発明の金属コロイド溶液は、保存安定性、pH 安定性を示し、ウイルス除去膜のインテグリティ試験用のウイルス代替粒子として好適である。

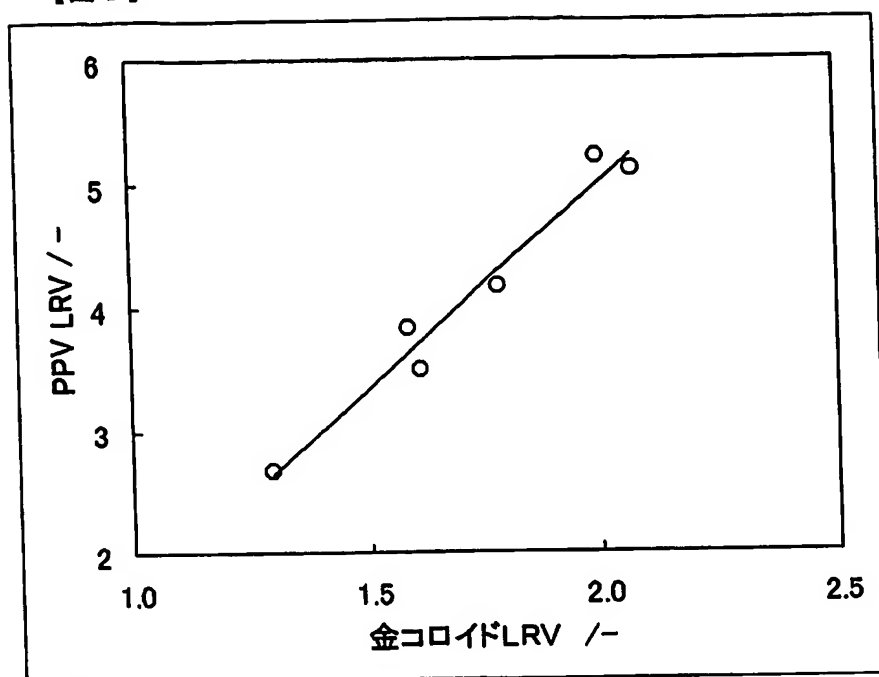
【図面の簡単な説明】

【0032】

【図 1】金コロイドの除去性とブタパルボウイルス (PPV) 除去性との相関関係を示した図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 保存安定性、pH安定性を示し、ウイルス除去膜のインテグリティ試験用のウイルス代替粒子として有用な金属コロイド溶液の提供。

【解決手段】 平均粒子径1～100nmの金属コロイド粒子及び水溶性高分子量分散剤及び水または／および水溶性有機溶剤を含み、pHが4から11の範囲であることを特徴とする金属コロイド溶液。

【選択図】 選択図なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-422496
受付番号	50302095194
書類名	特許願
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成16年 1月 5日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	303046299
【住所又は居所】	東京都千代田区神田美土代町9番地1
【氏名又は名称】	旭化成ファーマ株式会社

特願 2 0 0 3 - 4 2 2 4 9 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 3 0 4 6 2 9 9]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 8 月 2 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区神田美土代町 9 番地 1

氏 名

旭化成ファーマ株式会社